

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. S. JANSSEN.)

Untersuchungen über die Gewinnung antithyreotroper Wirkstoffe aus Blut.

Von

Arnold Loeser und V. M. Trikojus, Sydney.

I. Einleitung.

Nach den übereinstimmenden Untersuchungen von HEROLD¹⁾, EITEL und LOESER²⁾, SCOWEN und SPENCE³⁾ sowie ROWLANDS und PARKES⁴⁾ enthält das normale tierische und menschliche Blut Stoffe, die die Schilddrüse gegen das thyreotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens schützen. Diese Erkenntnis gründet sich auf folgende Beobachtung: Injiziert man einem Meerschweinchen an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich 2 ccm Blut oder Serum und gibt dem Tier am 5. und 6. Tage noch zusätzlich bekannte Mengen thyreotropen Hormons, dann werden die charakteristischen anatomischen Veränderungen in der Schilddrüse, wie sie bei alleiniger Verabreichung des Hormons auftreten — Wucherung des Epithels, Vakuolisierung und Resorption des Kolloids —, unterdrückt⁵⁾.

Die Stärke der antithyreotropen Wirkung des Blutes ist bei den einzelnen Tierarten verschieden. Bei Schaf, Pferd und Ratte scheint sie größer zu sein als beim Rind, bei der Ziege und beim Kaninchen⁶⁾.

1) HEROLD, Z. exper. Med. Bd. 90, S. 685, 1933.

2) EITEL und LOESER, Klin. Wschr. 1934, S. 1677 u. 1742; Arch. f. exper. Path. Bd. 177, S. 743, 1935. LOESER, Zbl. inn. Med. Bd. 27, S. 574, 1936.

3) SCOWEN und SPENCE, J. of Physiol. Bd. 86, S. 110, 1936.

4) ROWLANDS und PARKES, Proc. roy. Soc. Lond. Bd. 120, S. 118, 1936.

5) EITEL und LOESER, Klin. Wschr. 1934, S. 1677.

6) LOESER, Zbl. inn. Med. Bd. 27, S. 574, 1934; Klin. Wschr. 1937 im Druck. ROWLANDS und PARKES, Proc. roy. Soc. Lond. Bd. 120, S. 118, 1936.

Man kann sie jedoch steigern, wenn man den Tieren längere Zeit thyreotropes Hormon oder Thyroxin zuführt¹⁾.

Diese Feststellungen gestatten einen empfindlichen Nachweis sowie eine quantitative Auswertung und ermöglichen dadurch den Versuch, den Hemmungsstoff aus dem Blute zu isolieren.

Die Gewinnung läßt sich nach den Angaben von COLLIP und ANDERSON²⁾ in der Weise durchführen, daß man den Gehalt des Blutes an antithyreotropem Wirkstoff zunächst durch eine Vorbehandlung der als Blutspender dienenden Tiere mit thyreotropem Hormon steigert und das abgetrennte Serum mit Azeton fraktioniert fällt. Dabei sollen eiweißfreie Extrakte erhalten werden, die sich in 66%igem Azeton lösen und von 92%igem ausgefällt werden. Für Blut unbehandelter Tiere ist diese Methode nach eigenen Versuchen nicht anwendbar. Nach ANSELMINO und HOFFMANN³⁾ u. a. werden dagegen auch aus normalem Blut wirksame Extrakte erhalten, wenn man das Blut mit Lipoidlösungsmitteln extrahiert.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Isolierung und die Reinigung von Trockenextrakten aus Blut nicht vorbehandelter Tiere berichtet, die die Wirkungen des thyreotropen Hormons aufheben.

II. Verfahren zur Gewinnung antithyreotroper Wirkstoffe aus Blut.

Als Ausgangsmaterial für die nachstehenden Versuche diente frisches Hammelblut bzw. Hammelserum. Die Isolierung des Wirkstoffes aus diesen Rohprodukten wurde durch unsere Beobachtung ermöglicht, daß sich die antithyreotrope Substanz beim Schütteln von Blut oder Serum mit Aktivkohle an die Kohle bindet und durch nachträgliche Elution mit geeigneten Lösungsmitteln wieder von der Kohle getrennt werden kann.

Beispiel: 200 ccm Blut in 200 ccm Wasser werden mit 15 g Aktivkohle (SCHERING-KAHLBAUM) versetzt und 1—2 Stunden auf der Maschine stark geschüttelt. Der durch Zentrifugieren abgetrennte Kohlerückstand wird sodann mit 400 ccm 1% Ammoniak enthaltendem 60%igem Azeton vermischt und die Mischung wieder 1 Stunde geschüttelt. Anschließend wird zentrifugiert, der Rück-

¹⁾ Literatur siehe LOESER, Arch. f. exper. Path. Bd. 184, S. 33, 1936; Zbl. inn. Med. Bd. 27, S. 569, 1936.

²⁾ COLLIP und ANDERSON, Lancet 1934, S. 784.

³⁾ ANSELMINO und HOFFMANN, Klin. Wschr. 1933, S. 99.

stand mit 100 ccm Azeton-Ammoniakmischung nachgewaschen, und die mit der Waschflüssigkeit vereinigte Lösung unter vermindertem Druck bei 30—40° bis zur Trockene eingedampft.

Ausbeute: 3,3 g. Braunschwarzes, in Wasser fast unlösliches Pulver, das den Schutzstoff enthält.

Auswertung.

1. Prüfung des Ausgangsmaterials (unverdünntes Hammelblut): Ein Meerschweinchen erhält in der eingangs angegebenen Weise an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich 2 ccm Blut intraperitoneal (= i. p.) und am 5. und 6. Tage gleichzeitig je 2,5 MsE (= Meerschweincheneinheiten) thyreotropes Hormon. Sektion und histologische Untersuchung der Schilddrüse am 7. Tage.

Ergebnis: Normale Drüse.

2. Prüfung der mit Kohle behandelten wässrigen Blutlösung: Zwei Meerschweinchen erhalten an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich 4 ccm wässrige Blutlösung (entsprechend 2 ccm Blut) i. p. Am 5. und 6. Tage erhält ein Tier je 2,5, das andere je 5 MsE thyreotropes Hormon. Sektion und histologische Untersuchung der Schilddrüsen am 7. Tage.

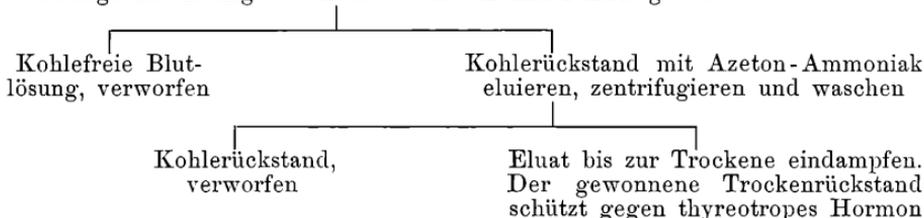
Ergebnis: Die Schilddrüsen sind in beiden Fällen basedowifiziert, d. h. beide Drüsen zeigen starke Epithelwucherung und Abnahme des färbbaren Kolloids.

3. Prüfung des gewonnenen Trockenrückstandes: Zwei Meerschweinchen erhalten an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich gleiche Mengen Trockenextrakt in Kochsalzlösung suspendiert i. p. Gesamtmenge für jedes Tier 200 mg. Am 5. und 6. Tage werden dem einen Tier täglich 5, dem zweiten täglich 10 MsE thyreotropes Hormon injiziert. Sektion und histologische Untersuchung der Schilddrüsen am 7. Tage.

Ergebnis: In beiden Fällen Ruhedrüse.

Schematische Darstellung des Arbeitsverfahrens

Wässrige Blutlösung mit Kohle schütteln und zentrifugieren



Eine weitere einfache Möglichkeit der Isolierung fanden wir in der Adsorption des Wirkstoffes an feste organische Säuren, wie Benzoessäure u. a., die in Wasser schwer löslich sind. Fügt man nämlich zu einer wässerigen Serumlösung eine alkoholische Lösung von Benzoessäure, dann fällt die organische Säure aus und reißt den Schutzstoff mit nieder. Durch Behandeln des Niederschlages mit Azeton, Äther oder Alkohol werden benzoessäurefreie wirksame Präparate erhalten.

Beispiel: 1000 ccm aus Mischblut gewonnenes Hammelserum werden nach Zugabe von 1000 ccm Wasser unter Rühren langsam mit einer Lösung von 30 g Benzoessäure in 100 ccm Alkohol versetzt. Nach etwa 12—15 stündigem Stehen im Eisschrank wird der gebildete Niederschlag zentrifugiert und mit 500 ccm Wasser (d. h. mit $\frac{1}{4}$ des Gesamtvolumens) auf der Zentrifuge gründlich gewaschen. Blutlösung und Waschwasser werden verworfen.

Zur Entfernung der Benzoessäure übergießt man den Rückstand mit 2500 ccm Azeton und läßt das Gemisch, das mehr als 90 % Azeton enthält unter häufigem Umrühren 1—2 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wird der unlösliche Anteil filtriert und nach Auswaschen mit 500 ccm Azeton über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Weiß- bis braungefärbtes in Wasser schwer lösliches, lockeres Pulver = SB. Ausbeute ca. 30—35 g, d. h. 360—420 mg entsprechen 12 ccm Serum.

Je nach der Wirksamkeit des Ausgangsserums, die bei jeder Aufarbeitung gleichzeitig festgestellt wird, unterdrückt die 12 ccm Serum äquivalente Menge Trockensubstanz die Wirkung von 10 MsE thyreotropen Hormons.

Auswertung.

1. Prüfung des Ausgangsserums: Zwei Meerschweinchen erhalten an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich 2 ccm Serum i. p. Am 5. und 6. Tage werden gleichzeitig mit dem Serum je 5 MsE thyreotropes Hormon injiziert. Sektion und histologische Untersuchung der Schilddrüsen am 7. Tage.

Ergebnis: In beiden Fällen Ruhedrüse.

2. Prüfung des gewonnenen Niederschlages SB: Zwei Meerschweinchen erhalten an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich gleiche Mengen Niederschlag SB in Kochsalzsuspension i. p. Gesamtmenge für jedes Tier 420 mg entsprechend 12 ccm Serum. Ge-

samtmenge thyreotropes Hormon wie oben 10 MsE. Sektion und histologische Untersuchung der Schilddrüsen am 7. Tage.

Ergebnis: In beiden Fällen Ruhedrüse.

Die Wiederholung der Auswertung nach 3 und 6 Monaten ergab keine Abnahme der Wirksamkeit.

Zur weiteren Reinigung werden 9 g des fein gepulverten Präparates SB in 400 ccm wässriger ammoniakalischer Azetonlösung (60 % Azeton — 1 % Ammoniak) eingetragen und die Suspension 2 Stunden stark geschüttelt. Nach dem Filtrieren und wiederholtem 2stündigem Schütteln des nicht in Lösung gegangenen Rückstandes mit 200 ccm Azeton-Ammoniakmischung wird der unlöslich gebliebene Anteil abzentrifugiert, mit Azeton-Ammoniak gewaschen und über Phosphorpenoxyd getrocknet. Weißes bis braunes festes Pulver = SB₁, das keine bzw. nur geringe antithyreotrope Wirkung besitzt.

Die bei der Extraktion gewonnenen Lösungen werden vereinigt und unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingedampft (Wasserbadtemperatur 35—45°). Zur Entfernung von gefärbten Produkten wird der Trockenrückstand mit etwa 500 ccm Azeton verrieben, filtriert und getrocknet.

Weißes bis gelbbraunes geschmack- und geruchloses Pulver = SB₂, das sich in Wasser nicht vollständig löst.

Ausbeute ca. 500 mg.

20 mg entsprechend etwa 12 ccm Serum schützen gegen 5 MsE thyreotropen Hormons.

Auswertung.

Zwei Meerschweinchen erhalten an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich gleiche Mengen Trockenextrakt SB₂ in Kochsalzsuspension i. p. Gesamtmenge für jedes Tier 20 mg entsprechend etwa 12 ccm Serum. Gesamtmenge thyreotropes Hormon 5 MsE. Sektion und histologische Untersuchung der Schilddrüsen am 7. Tage.

Ergebnis: In beiden Fällen Ruhedrüse.

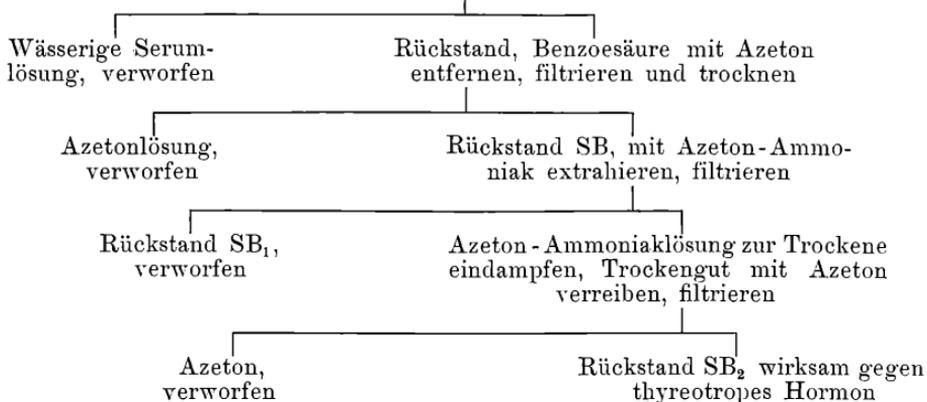
Wird die Hormonmenge auf 10 MsE erhöht, dann werden die anatomischen Veränderungen in der Schilddrüse nicht mehr vollständig unterdrückt.

Wirksame Produkte lassen sich auch gewinnen, wenn die bei der Extraktion des Niederschlages SB erhaltenen Lösungen nur bis zur Beseitigung des Azetons und Ammoniaks (in dem angegebenen Beispiel bis etwa 200 ccm) eingedampft und anschließend mit einer

Lösung von 4 g Benzoessäure in 12 ccm Alkohol versetzt werden. Nach dem Filtrieren und Waschen der dabei entstehenden Fällung mit 50 ccm Wasser wird der Filtrerrückstand 1—2 Stunden mit 250 ccm Azeton stehen gelassen, zentrifugiert und getrocknet.

Schematische Darstellung des Arbeitsverfahrens:

Wässrige Serumlösung mit alkoholischer Benzoessäurelösung fällen, zentrifugieren



Die Isolierung wirksamer Produkte läßt sich auch in der Weise durchführen, daß man eine 60 % Azeton — 1 % Ammoniak enthaltende Serumlösung längere Zeit schüttelt, den gebildeten Niederschlag filtriert und das Filtrat einer Fällung mit Benzoessäure unterwirft.

Beispiel: 700 ccm Serum werden nach Zugabe von 28 ccm 25 %iger Ammoniaklösung unter Rühren langsam mit einer Lösung von 42 ccm 25 %igem Ammoniak in 1050 ccm Azeton versetzt, so daß die Gesamtmischung 60 % Azeton — 1 % Ammoniak enthält. Es bildet sich sofort ein gelb-roter bis weißer Niederschlag, der 2 Stunden auf der Maschine stark geschüttelt wird. Anschließend wird zentrifugiert und der Rückstand nochmals mit 400 ccm Azeton-Ammoniakgemisch (= $\frac{1}{5}$ des ursprünglichen Gesamtflüssigkeitsvolumens) 2 Stunden auf der Schüttelmaschine extrahiert. Nach dem Zentrifugieren und Waschen mit 200 ccm (= $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Gesamtflüssigkeitsvolumens) Azeton-Ammoniaklösung wird der Rückstand mit Azeton übergossen, filtriert und getrocknet. Braunes bis weißes festes Pulver, das keine bzw. nur geringe antithyreotrope Wirkung besitzt.

Zur Gewinnung des antithyreotropen Wirkstoffes werden die bei der Extraktion erhaltenen Lösungen vereinigt und bei 30—35° vorsichtig auf etwa $\frac{1}{5}$ des ursprünglichen Volumens eingengt. Die kalte azetonfreie, nur noch schwach ammoniakalische Flüssigkeit

wird sodann vorsichtig mit Eisessig neutralisiert und unter Rühren langsam mit einer Lösung von 20 g Benzoesäure in 70 ccm Alkohol versetzt. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank wird der weiße Niederschlag abzentrifugiert, in 500 ccm Azeton eingetragen und die Mischung unter häufigem Umrühren etwa $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Anschließend wird der weiße Bodensatz filtriert, mit Azeton gewaschen und über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Geruch- und geschmackloses weißes Pulver, das sich in Wasser nicht vollständig löst. Leicht löslich in $n/_{100}$ Natronlauge. Ausbeute 5,4 g, d. h. 100 mg entsprechen 12 ccm Serum. Je nach der Wirksamkeit des Ausgangsserums unterdrücken 100 mg Trockensubstanz die Wirkung von 10 MsE thyreotropen Hormons.

Auswertung.

1. Prüfung des Ausgangsserums: Zwei Meerschweinchen erhalten an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich 2 ccm Serum i. p. Am 5. und 6. Tage werden den Tieren je 5 MsE thyreotropes Hormon injiziert. Sektion und histologische Untersuchung am 7. Tage.

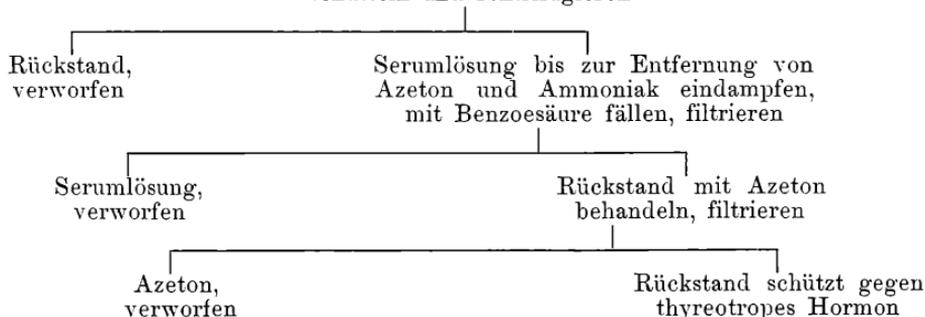
Ergebnis: In beiden Fällen normale Drüse.

2. Prüfung des Trockenextraktes: Zwei Meerschweinchen erhalten an sechs aufeinanderfolgenden Tagen täglich gleiche Mengen der gewonnenen Trockensubstanz in Kochsalzsuspension i. p. Gesamtmenge für jedes Tier 100 mg. Gesamtmenge thyreotropes Hormon wie oben 10 MsE. Sektion und histologische Untersuchung der Schilddrüsen am 7. Tage.

Ergebnis: In beiden Fällen Ruhedrüse.

Schematische Darstellung des Arbeitsverfahrens:

60 % Azeton — 1 % Ammoniak-haltige wässrige Serumlösung,
schütteln und zentrifugieren



III. Zusammenfassung.

Es werden Methoden zur Gewinnung von antithyreotrop wirksamen Trockenextrakten aus Blut nicht vorbehandelter Tiere beschrieben:

1. Durch Adsorption des Wirkstoffes an Aktivkohle und nachfolgende Elution mit wässriger ammoniakalischer Azetonlösung, oder
2. Durch Adsorption des Wirkstoffes an feste organische Säuren, die in Wasser schwer löslich sind und aus ihren Lösungen in organischen Lösungsmitteln, wie Azeton, Alkohol u. a., durch Wasser ausgefällt werden, oder
3. Durch Adsorption des Wirkstoffes an Eiweißniederschläge aus Blut oder Serum.

In allen Fällen lassen sich antithyreotrop wirksame Stoffe gewinnen, d. h. Stoffe, die die Schilddrüse gegen die Wirkung des thyreotropen Hormons schützen.

Die Versuche werden fortgesetzt.

(Ausgeführt mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft: „ROCHE-Fonds“.)

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der naturforschenden Gesellschaft zu Freiburg im Breisgau](#)

Jahr/Year: 1936

Band/Volume: [35](#)

Autor(en)/Author(s): Loeser Arnold, Trikojus V.M.

Artikel/Article: [Untersuchungen über die Gewinnung antithyreotroper Wirkstoffe aus Blut. 211-218](#)